

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.
Vol. 17, 1979, pp. 105–110

Nachweis einer typenspezifischen Mikroheterogenität des humanen Thyroxin-bindenden Globulins durch isoelektrische Fokussierung

Von W. Petek

Institut für Medizinische Biochemie (Vorstand Prof. Dr. A. Holasek) der Universität Graz

(Eingegangen am 2. Juni/11. September 1978)

Zusammenfassung: Es wird eine rasch durchführbare Methode zur Isolierung des Thyroxin-bindenden Globulins aus nur 150 ml Plasma beschrieben. Wesentlich war die Präparation einer hochaktiven Thyroxin-Sepharose, die ausschließlich kovalent gebundenes *L*-Thyroxin enthielt, und die Elution des Proteins unter spezifisch hydrophoben Bedingungen. Durch isoelektrische Fokussierung von 15 individuellen Präparationen des Thyroxin-bindenden Globulins gelang es nach densitometrischer Auswertung der Polyacrylamidgele, eine unterschiedliche Verteilung der drei darstellbaren Proteinbanden nachzuweisen. Innerhalb der untersuchten Probanden konnten drei Verteilungstypen nachgewiesen werden. Die Ergebnisse dieser Untersuchung weisen darauf hin, daß die Typen individualspezifisch sind, während geschlechtsspezifische Unterschiede nicht nachweisbar waren.

Evidence of type-specific microheterogeneity of thyroxine-binding globulin by isoelectric focusing

Summary: A rapid method for the isolation of the thyroxine-binding globulin from only 150 ml plasma is described. The preparation of a high-activity thyroxine-sepharose is essential; this contained *L*-thyroxine bound exclusively by covalent linkage. Furthermore, the elution of the protein was performed under specifically hydrophobic conditions. Using isoelectric focusing on 15 individual preparations of thyroxine-binding globulin, and densitometric analysis of the polyacrylamide gels, it was possible to show three protein bands in different proportions according to the individual. Three distribution-types were found in the tested volunteers. The results of this investigation show that these types are individual-specific, whereas there are no apparent sex-specific differences.

Einleitung

Das Thyroxin-bindende Globulin¹ ist das wichtigste Transportprotein für die Schilddrüsenhormone *L*-3, 5,3'-Triiodthyronin und *L*-Thyroxin². Seine Serumkonzentration, 10–20 mg/l, ist ein bedeutender Parameter bei der *in vitro* Diagnostik von Schilddrüsenerkrankungen (1, 2, 3). Es wurde in verschiedenen Laboratorien aus Serum oder Plasma isoliert und teilweise charakterisiert (4–9). Nilsson et al. (10) postulierten, daß das TBG aus vier identischen Untereinheiten aufgebaut sei, eine Behauptung, die kurze Zeit später von Gershengorn et al. (11) widerlegt wurde. Vor längerer Zeit konnte aber an TBG-Präparationen durch isoelektrische Fokussierung nachgewiesen werden, daß das Protein eine polymorphe Mikroheterogenität aufweist. Dies wurde erstmals von Marshall et al. (12) mitgeteilt, wobei 4

Subfraktionen angegeben wurden. Von Horn et al. (13) konnten jedoch an reinsten TBG-Präparationen aus Mischserum nur 3 Subfraktionen festgestellt werden. Es war daher naheliegend zu untersuchen, ob nicht durch geringfügige Unterschiede in den physiko-chemischen Eigenschaften individueller TBG-Präparationen differente Verteilungsmuster von TBG-Subfraktionen nachgewiesen werden können.

Material und Methoden

Probenmaterial

Das Acidum-Citricum-Dextrose-Plasma³ stammte von klinisch gesunden Spendern und wurde vom Department für Blutgruppenserologie der Univ. Klinik für Chirurgie, Graz, zur Verfügung gestellt. Das Mischserum wurde aus verschiedenen klinischen Laboratorien bezogen.

¹) Thyroxin-bindendes Globulin
²) *L*-Thyroxin
³) Acidum-Citricum-Dextrose-Plasma

TBG
*T*₄
ACD-Plasma

⁴) *L*-Thyroxin-Sepharose
⁵) 8-Anilinonaphthalinsulfonsäure- (1) Ammoniumsalz
*T*₄-Sephyrose
ANS

Reagenzien

Sephacrose 4 B, ConcanavalinA-Sepharose und Sephadex G 25 fine stammten von Pharmacia. Na^{125}I (3, 7 TBq/l) und das ^{125}I -Thyroxin (1,85 GBq/l) waren Produkte von Radiochemical Centre, Amersham.

Der mikrogranuläre Anionenaustauscher Diethylaminoethyl-Cellulose, DE-32, stammte von der Firma Whatman. Das α -Methylmannosid war von SIGMA und die Agarose ein Produkt von Bio-Rad. Sämtliche Reagenzien für die Diskelektrophorese und die analytische Elektrofokussierung waren von Serva, nur das Ampholine pH 3,5–5,0 stammte von LKB (Bromma, Schweden). Die Lactoperoxidase (EC 1.11.1.7) wurde von Boehringer-Mannheim bezogen. Die verschiedenen Antihumanseren stammten von Behring, das Thiazinrot R war von Fluka. Das Antiserum „Kaninchen Immunglobuline gegen das Thyroxin-bindende Globulin“ 10-K 40 stammte von Dakopatts (Medac, Hamburg). Alle anderen Chemikalien waren von analytischer Reinheit und wurden von Merck Darmstadt bezogen.

Geräte

Zur Molekulargewichtsbestimmung wurde eine analytische Beckman Ultrazentrifuge Modell E verwendet. Die Auswertung der Polyacrylamidgele erfolgte mit einem Densitometer der Firma Vernon (Paris). Der Gammazähler Typ BF 1015 war ein Produkt von Berthold. Die RC-5 Hochgeschwindigkeitszentrifuge stammte von Sorvall, (Newton, Mass., USA). Die Einrichtung für die analytische Fokussierung stammte von LKB.

Präparation der L-Thyroxin-Sepharose⁴

Die für die biospezifische Adsorption des TBG erforderliche T_4 -Sepharose wurde durch kovalente Bindung von T_4 an die Gelmatrix hergestellt. 100 ml feuchte Sepharose 4 B wurden nach der Bromcyanaktivierungsmethode von Cuatrecasas (14) nach einer Modifikation von Pensky et al. (4) mit 130 μmol T_4 umgesetzt. Die Ausbeute bei der Kupplung des T_4 an die Sepharose wurde durch Einsatz von ^{125}I -Thyroxin ermittelt. Sie betrug unter optimalen Bedingungen 50–60 % der eingesetzten T_4 -Menge entsprechend einer Beladung des Gels mit 0,65–0,78 mmol/l T_4 . Trotz vieler Vorversuche und vor allem Änderung der eingesetzten T_4 -Menge wiesen die T_4 -Sepharosen aber eine unterschiedliche Qualität auf. Um unspezifisch an der T_4 -Sepharose haftendes T_4 zu entfernen, wurde die Methode (4) insofern modifiziert, als nach dem Abblocken noch aktiver Gruppen mit Ethanolamin die frische T_4 -Sepharose zuerst für 10 min in 0,1 mol/l NaOH inkubiert wurde.

Hydrophobe Natur der TBG Bindung an die T_4 -Sepharose

2 l Mischserum wurden mit 80 ml T_4 -Sepharose und 7,4 MBq ^{125}I -TBG 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die T_4 -Sepharose wurde hernach auf einer Glasfritte G 2 portionsweise mit 3 l 10 mmol/l Tris/HCl Puffer, 0,5 mol/l NaCl, pH 8,0 weitgehend proteinfrei gewaschen, in eine Säule (2,5 x 30 cm) gefüllt und mit 2 x 500 ml gleichem Puffer eluiert. Hierauf wurde die T_4 -Sepharose mit 2 x 500 ml 10 mmol/l Tris/HCl Puffer pH 8,0 gewaschen und anschließend das TBG mit 3 x 500 ml 10 mmol/l Tris/HCl Puffer, 0,16 mmol/l 8 Anilinonaphthalinsulfonsäure-(1) Ammoniumsalz⁵, pH 8,0 abgelöst. Die Ausbeute an TBG bei der Adsorption wurde aus der eingesetzten Aktivität und deren Wiederfindung im Serum nach der Inkubation berechnet. Die Verluste bei den Waschvorgängen durch Verminderung der Salzkonzentration des Puffers und die Prozentsätze an Aktivität, die durch ANS-haltigen Puffer eluiert werden konnten, sind aus Tabelle 1 zu ersehen.

Präparation des TBG aus ACD-Plasma

150 ml Plasma wurden 20 min bei 13700 g in einer Sorvall-Hochgeschwindigkeitszentrifuge RC-5 zentrifugiert. Die Adsorption des TBG aus dem Plasma erfolgte anschließend durch 10 ml T_4 -Sepharose in Plastiksäulen (8,5 x 1,8 cm) mit einer Durchlaufgeschwindigkeit von 1,0 ml/min. Unspezifisch gebundene Plasmaproteine wurden durch extensives Waschen mit 500 ml 0,1 mol/l Tris/HCl Puffer pH 8,0 aus der Säule entfernt. Die Elution des TBG gemeinsam mit anderen T_4 -bindenden Proteinen erfolgte hierauf mit 120 ml 0,1 mol/l Tris/HCl Puffer 0,16 $\mu\text{mol/l}$ T_4 , pH 8,0, direkt auf einer mit 1 ml ConA-Sepharose gefüllte Plastiksäule (10,0 x 0,8 cm), wobei Albumin und Präalbumin quantitativ entfernt werden konnten. Anschließend wurde die ConA-Sepharose mit 100 ml 0,1 mol/l Tris/HCl pH 8,0 gewaschen und das TBG sowie γ -Globuline mit 100 ml 0,1 mol/l Tris/HCl Puffer, 50 mmol/l α -Methylmannosid, pH 8,0 eluiert und sofort gegen einen 50 mmol/l Tris/HCl Puffer pH 8,0 dialysiert. Die endgültige Reinigung erfolgte über eine DE-32 (1 ml) in Plastiksäulen (10,0 x 0,8 cm), wobei durch Waschen der DE-32 mit 50 ml 50 mmol/l Tris/HCl Puffer, 50 mmol/l NaCl, pH 8,0 die γ -Globuline entfernt werden konnten. Das TBG wurde durch 10 ml 50 mmol/l Tris/HCl Puffer, 80 mmol/l NaCl, pH 8,0 abgelöst und das Volumen des Eluates durch Druckdialyse auf 2 ml eingeeengt.

pharose gefüllte Plastiksäule (10,0 x 0,8 cm), wobei Albumin und Präalbumin quantitativ entfernt werden konnten. Anschließend wurde die ConA-Sepharose mit 100 ml 0,1 mol/l Tris/HCl pH 8,0 gewaschen und das TBG sowie γ -Globuline mit 100 ml 0,1 mol/l Tris/HCl Puffer, 50 mmol/l α -Methylmannosid, pH 8,0 eluiert und sofort gegen einen 50 mmol/l Tris/HCl Puffer pH 8,0 dialysiert. Die endgültige Reinigung erfolgte über eine DE-32 (1 ml) in Plastiksäulen (10,0 x 0,8 cm), wobei durch Waschen der DE-32 mit 50 ml 50 mmol/l Tris/HCl Puffer, 50 mmol/l NaCl, pH 8,0 die γ -Globuline entfernt werden konnten. Das TBG wurde durch 10 ml 50 mmol/l Tris/HCl Puffer, 80 mmol/l NaCl, pH 8,0 abgelöst und das Volumen des Eluates durch Druckdialyse auf 2 ml eingeeengt.

Maximale T_4 -Bindungskapazität

20 μg TBG in 100 μl 0,1 mol/l Tris/HCl Puffer, 0,8 $\mu\text{mol/l}$ T_4 , pH 8,0 wurden 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Hierauf wurde das gebundene T_4 in Plastiksäulen (10,0 x 0,5 cm), die mit 3 ml Sephadex G 25 fine gefüllt waren, mit einem 0,1 mol/l Tris/HCl Puffer pH 8,0 vom freien T_4 abgetrennt. Das an TBG gebundene T_4 wurde durch nasse Versäuerung als T_4 -Iod (15, 16) bestimmt. Die quantitative TBG-Bestimmung erfolgte mittels Elektroimmunodiffusion (17) unter gleichen Bedingungen, wie bei Kranz et al. (18) angegeben, wobei ein selbst hergestelltes Anti-TBG-Serum von Kaninchen eingesetzt wurde. Als Standard diente ein mit TBG aufgestocktes Normalserum, dessen TBG-Konzentration (73,5 mg/l) von Dr. Bradwell, Birmingham, England, bestimmt worden war.

^{125}I Iod Markierung des TBG

Das zur Iodmarkierung verwendete reinste TBG wurde, wie oben beschrieben, aus Mischplasma isoliert. Es wurde sowohl nach der Chloramin-T Methode (19) als auch nach der Lactoperoxidase-Methode (20) mit einer Ausbeute von 20–30 % iodiert. Wegen der größeren Verluste an Bindungsfähigkeit für T_4 durch Oxidation des Proteins bei der Chloramin-T Methode (21) wurde der schonenderen Iodierung mit Lactoperoxidase der Vorzug gegeben.

Elektrophoretische Methoden

Zur Reinheitsüberprüfung der TBG-Präparation wurde die analytische Diskelektrophorese nach Weber & Osborne (22) verwendet. Die immunoelektrophoretische Untersuchung der TBG-Rohpräparationen wurden in 20 g/l Agarose in einem 20 mmol/l Barbitallpuffer pH 8,2, Ionenstärke $\mu = 0,025$, durchgeführt. Die Laufzeit bei 5 mA pro Objektträger betrug 1,5 h.

Molekulargewichtsbestimmung des TBG

Das Molekulargewicht des TBG wurde mit einer analytischen Ultrazentrifuge (Beckman Modell E) nach der Sedimentations-Gleichgewichtsmethode (23) bestimmt. Dazu wurde eine TBG-Präparation aus Mischserum verwendet, die nach der gleichen Methode, wie bei Plasma angegeben, isoliert worden war. Die Proteinkonzentration betrug 0,5 g/l ($\rho = 1,0055$). Als \bar{V} wurde 0,734 angenommen. Die Laufzeit betrug 24 h, die Rotordrehzahl 30000 Umdrehungen/min und die Rotortemperatur $T = 298,0$ K.

Isoelektrische Fokussierung der TBG-Präparationen

Die analytische isoelektrische Fokussierung wurde mit einigen Abänderungen, die Vorbereitung der Färbelösung zur Gänze, nach Malik & Berrie (24) durchgeführt.

Lösung A: 0,56 mol/l Acrylamid und 52 mmol/l N,N'-Methylenbisacrylamid

Lösung B: 16 mmol/l Riboflavin

Lösung C: 1,32 mmol/l N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin

Lösung D: 40 g/l Ampholine pH 3,5–5,0

Je 380 μl der Lösungen A,B,C und 65 μl D wurden vorgemischt und 760 μl der wässrigen TBG-Lösung (71,0–97,5 mg/l TBG) hinzugefügt. Das Gemisch wurde in Glasröhrchen (8,0 x 0,5 cm) gefüllt und hierauf 1 h bei 355 nm photopolymerisiert. Als Anodenflüssigkeit diente 20 mmol/l o-Phosphorsäure und kathodisch wurde 67 mmol/l Triethanolamin verwendet. Bei einer konstanten Spannung von 200 V wurde 10 h bei 4°C

fokussiert. Zur Fixierung der Proteinbanden und zur Entfernung des Ampholines wurden die Gele 24 h in 0,76 mol/l Trichloressigsäure eingebracht. Die Gele wurden für 24 h in der wegen Interferenz mit dem Ampholine speziell aufbereiteten Farbe Coomassie brilliant blue G 250 (24) inkubiert und anschließend in destilliertem Wasser aufbewahrt.

Statistische Methoden

Das Verhalten der durch isoelektrische Fokussierung darstellbaren drei Subfraktionen F_1 – F_3 innerhalb der drei beschriebenen TBG-Verteilungstypen wurden mittels des *Duncan*-Tests untersucht (25).

Ergebnisse

Präparation des TBG aus ACD-Plasma

In den aus ACD-Plasma mit T_4 als Effektor gewonnenen TBG-Präparationen konnten in den Eluaten nach der T_4 -Sephrose immunochemisch neben dem TBG noch Präalbumin, Albumin und γ -Globuline nachgewiesen werden (Abb. 1). Nach der ConA-Sephrose waren als Verunreinigung noch γ -Globuline zu finden, während nach der DE-32 immunochemisch und diskelektrophoretisch, wie aus Abbildung 2 ersichtlich, nur noch TBG in der Präparation vorhanden war. Diskelektrophoretisch waren die Präparationen bei drei verschiedenen Gelkonzentrationen und auch in harnstoffhaltigen Gelen einheitlich. Nur an der Grenze zwischen Sammelgel und Trenngel kam bei einzelnen Präparationen eine schwach anfärbbare Bande zur Darstellung. Trotz der extrem niedrigen physiologischen TBG-Konzentration von 10–20 mg/l konnten davon 20–25% in reiner Form aus dem Plasma isoliert werden.

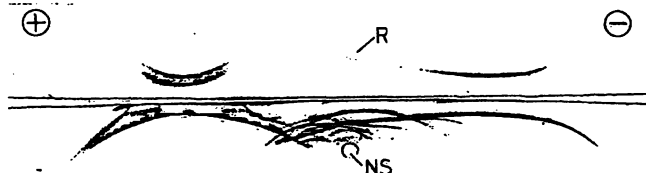


Abb. 1. Immunelektrophorese einer mit T_4 als Effektor abgelösten TBG-Rohpräparation (R) und eines Normalserums (NS). Die Trennung erfolgte in 20 g/l Agarose in einem 20 mmol/l Barbitalpuffer pH 8,2, Ionenstärke 0,025 (3 ml pro Objektträger), durch 1,5 h bei 5 mA konst. Stromfluß. Entwickelt wurde mit einem polyvalenten Anti-Humanserum und die Färbung erfolgte mit Thiazinrot R. In der TBG-Rohpräparation (R) sind Präalbumin, Albumin und IgG nachweisbar.

Hydrophobe Natur der TBG-Bindung

Nach zweistündiger Inkubation der T_4 -Sephrose im Mischserum, welches eine durchschnittliche Osmolarität von 0,29 osmol/l besitzt, waren 80% der eingesetzten Aktivität gebunden. Das Verhalten des gebundenen Anteils des ^{125}I -TBG während des Waschens der T_4 -Sephrose mit den beiden Puffern sowie die Ausbeute bei der Elution mit dem ANS-haltigen Puffer ist aus der Tabelle 1 ersichtlich. 5,2% der an der T_4 -Sephrose haftenden Aktivität konnten nur durch 0,1 mol/l NaOH entfernt werden. Die hydrophobe Natur der Bindung des TBG an die T_4 -Sephrose ist aus dem Verhalten beim Waschen

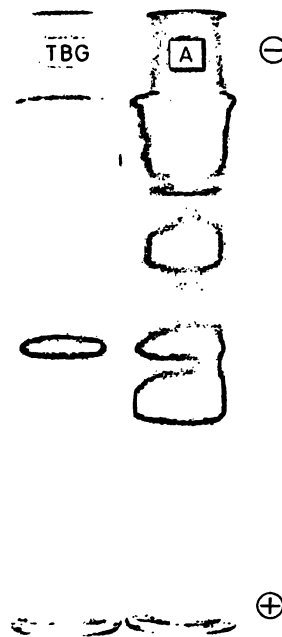


Abb. 2. Diskelektrophorese einer mit 10 mmol/l Tris/HCl Puffer, 0,16 mmol/l ANS, pH 8,0 gewonnenen TBG-Rohpräparation (A) und von 60 μg reinstem TBG nach Ionenaustauschchromatographie mittels DE-32 (TBG). Die Färbung der Gele erfolgte mit 10 g/l Amidoschwarz 10 B in 1,16 mol/l Essigsäure.

durch Erniedrigung der Salzkonzentration des Puffers und der Elution durch ANS-haltigen Puffer zu ersehen. Die mit ANS gewonnenen TBG-Präparationen waren aber noch mit zumindest 11 anderen Plasmaproteinen verunreinigt (Abb. 3). Bei den weiteren Experimenten



Abb. 3. Reinste TBG-Präparationen wurden in Polyacrylamidgele, pH Gradient 3,5–5,0, durch Elektrofokussierung während 10 h bei 200 V konst., in drei Subfraktionen (F_1 – F_3) aufgetrennt. Die Proteinfractionen wurden durch 0,76 mol/l Trichloressigsäure fixiert und mit vorgereinigtem Coomassie brilliant blue G 250 gefärbt.

wurde daher nur noch mit einer Puffermolarität von 0,1 mol/l gearbeitet und als Effektor T_4 eingesetzt.

Molekulargewicht und maximale T_4 -Bindungskapazität des TBG

Die Auswertung der Molekulargewichtsbestimmung nach *Yphantis* (23) ergab für das TBG ein Molekulargewicht von 52800 Dalton. An mehreren TBG-Präparationen aus Mischserum und -plasma konnte eine maximale Beladung des Proteins mit T_4 von 14,2 $\mu\text{g}/\text{mg}$ TBG erhalten werden. Aus diesen beiden Daten folgt, daß 0,96 mol T_4 pro mol TBG gebunden wurden und das TBG durch die hier beschriebene Präparationsmethode keine gravierenden Strukturänderungen erfahren haben kann.

Subtypen des TBG

Das TBG konnte durch isoelektrische Fokussierung in drei Banden unterschiedlich färbbarer Intensität aufgetrennt werden (Abb. 3). Wie aus Abbildung 4 ersichtlich, ergaben mit einem monospezifischen Anti-TBG-Serum alle drei Fraktionen eine immunochemisch einheitliche Reaktion. Die Präzipitationsbanden zeigen Fusion und das Muster vollständiger immunochemischer Identität. Ein weiterer Beweis dafür, daß es sich bei den drei Banden nur um TBG handelt, konnte dadurch erbracht werden, daß mit einem Serum eines Patienten mit genetisch bedingtem Fehlen des TBG keine immunochemische Reaktion erhalten werden konnte. Der isoelektrische Punkt der drei Proteine wurde nach Ausschneiden der Fraktionen aus den Gelen in den wäßrigen Eluatn ermittelt. Die anodisch gelegene Fraktion wies einen pH Wert von 4,15 (F_1), die mittlere einen pH von 4,30 (F_2) und die am weitesten kathodisch gelegene einen pH von 4,45 (F_3) auf. Nach densitometrischer Auswertung der gefärbten Gele ließen sich aus der Relation des Proteingehaltes der Subfraktionen zueinander eindeutig 3 Typen feststellen (Abb. 5). Von den 15 Probanden zeigten 8 den höchsten F_2 Anteil und wurden als Typ I bezeichnet, während F_3 beim Typ II dominierte. Beim Typ III war der Anteil von $F_2 : F_3$ etwa gleich groß (Tab. 2). Der F_1 Anteil war im *Duncan*-Test immer signifikant am niedrigsten. Innerhalb der Relativverteilung der drei Subfraktionen F_1-F_3 wiesen $F_1 : F_2$ und $F_1 : F_3$ bei allen drei Typen und $F_2 : F_3$

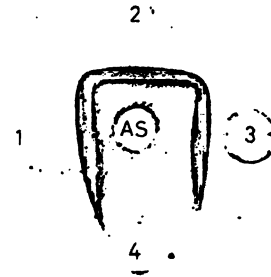


Abb. 4. Die Subfraktionen F_1 , F_2 und F_3 wurden nach analytischer Fokussierung durch Elution aus den Gelen gewonnen. 1–3 Material mit dem isoelektrischen Punkt: 4,15, 4,30 bzw. 4,45; 4: Serum eines Patienten mit genetisch bedingtem Fehlen des TBG. AS: monospezifisches Anti-TBG-Serum von Kaninchen.

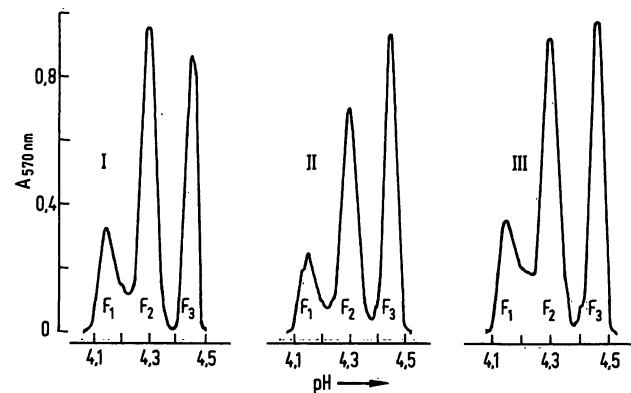


Abb. 5. Densitogramme von in Polyacrylamidgelen isoelektrisch fokussierten TBG-Präparationen. Unter gleichen Fokussierungsbedingungen wie in Abbildung 3 gelangten nach densitometrischer Auswertung der Gele bei 570 nm in jeder Präparation 3 Subfraktionen (F_1-F_3) zur Darstellung. Innerhalb der 15 untersuchten Präparationen wurden 3 Verteilungstypen (Typ I–III) festgestellt. Die prozentuellen Anteile von $F_1:F_2$ und $F_1:F_3$ wiesen bei allen drei Typen im *Duncan*-Test ein $p < 0,01$ und von $F_2:F_3$ beim Typ I und Typ II noch ein $p < 0,05$ auf, während beim Typ III kein signifikanter Unterschied bestand.

mit Ausnahme vom Typ III einen signifikanten Unterschied auf. Mit dem zahlenmäßig beschränkten Material konnte ein Verhältnis der Typen I : II : III von 8 : 5 : 2 erhoben werden. Geschlechtsspezifische Unterschiede waren nicht erkennbar.

Tab. 1. Einfluß von Puffermolarität, Natriumchloridkonzentration und ANS auf die Elution des ^{125}I -TBG von der T_4 -Sephrose.

| Schritt | Volumen (ml) | Puffer | | NaCl (mol/l) | ANS (mmol/l) | Aktivität im Eluat (%) |
|---------|--------------|-------------------|-----|--------------|--------------|------------------------|
| | | Tris/HCl (mmol/l) | pH | | | |
| 1 | 500 | 10 | 8,0 | 0,5 | | 2,2 |
| 2 | 500 | 10 | 8,0 | 0,5 | | 1,1 |
| 3 | 500 | 10 | 8,0 | | | 33,2 |
| 4 | 500 | 10 | 8,0 | | | 14,5 |
| 5 | 500 | 10 | 8,0 | | 0,16 | 29,5 |
| 6 | 500 | 10 | 8,0 | | 0,16 | 7,5 |
| 7 | 500 | 10 | 8,0 | | 0,16 | 6,7 |

Tab. 2. Typenspezifische Mikroheterogenität des TBG.

| Proband Alter/ Geschlecht | TBG Präparation (mg/l) | F ₁ pH 4,15 (mg/l) | F ₂ pH 4,30 (mg/l) | F ₃ pH 4,45 (mg/l) |
|---------------------------------|------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| Typ I | | | | |
| 48 ♂ | 86,9 | 16,9 | 38,1 | 31,9 |
| 23 ♂ | 71,9 | 14,2 | 29,5 | 28,2 |
| 25 ♀ | 75,0 | 15,8 | 32,3 | 26,9 |
| 19 ♂ | 86,9 | 16,8 | 38,2 | 31,9 |
| 37 ♂ | 72,8 | 16,6 | 29,0 | 27,2 |
| 31 ♂ | 82,1 | 19,7 | 35,5 | 26,9 |
| 24 ♀ | 74,9 | 16,0 | 30,3 | 28,6 |
| 29 ♀ | 71,0 | 10,8 | 31,5 | 28,7 |
| Typ II | | | | |
| 19 ♂ | 83,0 | 11,3 | 28,8 | 42,9 |
| 20 ♂ | 79,7 | 8,7 | 29,7 | 41,3 |
| 35 ♂ | 87,7 | 11,2 | 32,8 | 43,7 |
| 27 ♀ | 76,5 | 13,4 | 28,9 | 34,2 |
| 36 ♀ | 88,2 | 10,0 | 36,1 | 42,1 |
| Typ III | | | | |
| 23 ♂ | 86,4 | 13,8 | 36,3 | 36,3 |
| 19 ♂ | 97,5 | 13,9 | 41,6 | 42,0 |

Diskussion

Negative Einflüsse auf die Bindungsqualität der T₄-Sephrose resultieren aus der schlechten Löslichkeit des T₄ bei pH 8,6. Bereits bei der Kupplung an die bromcyanaktivierte Sepharose bleibt ein Teil des eingesetzten T₄ unspezifisch am Gel haften und führt bei der Adsorption des TBG aus dem Plasma zu unterschiedlich großen Verlusten. Durch Waschen der frisch bereiteten T₄-Sephrose mit 0,1 mol/l NaOH wird das gesamte nicht kovalent gebundene T₄ vom Gel entfernt und ermöglicht es, Ausbeuten bis zu 80% zu erreichen.

Der Effektor, 2 mmol/l KOH (4), erzeugt in der Säule durch Pufferwirkung der Proteine nur einen pH-Wert von 9,2 (11). Wie eigene Vorversuche zeigten, konnte durch einen 0,1 mol/l Tris/HCl Puffer pH 9,2 nur eine geringe Menge TBG von der T₄-Sephrose eluiert werden. Zum anderen wirkt sich aber die extrem niedere Molalität der Kalilauge nachteilig auf die Reinheit der TBG-Rohpräparationen aus. Neben dem TBG konnten in diesen Eluaten immunochemisch noch 11 weitere Serumproteine nachgewiesen werden. Die Elution des TBG bei relativ hoher Puffermolalität mit dem spezifischen Effektor T₄ lieferte hingegen wesentlich reinere TBG-Rohpräparationen.

In Übereinstimmung mit Horn et al. (13) konnten in den TBG-Präparationen aus Serum und Plasma drei Subfraktionen festgestellt werden. Gegensätzlich verhalten sich dazu die Ergebnisse von Marshall et al. (12), die zumindest 4 Subfraktionen postulieren. Eine Erklärung für diese divergierenden Ergebnisse von diesen beiden Arbeitsgruppen ist durch den Einsatz unterschiedlicher Effektoren gegeben. Bei Verwendung von Kalilauge oder

ANS-haltigen Puffern als Effektor konnte, wie in Vorversuchen festgestellt, immer eine größere Menge an α_1 -Antitrypsin im Eluat nachgewiesen werden. Mehrere physiko-chemische Eigenschaften dieses Proteins (26), wie Molekulargewicht, isoelektrischer Punkt, und die Zusammensetzung des Kohlenhydratanteils besitzen eine große Ähnlichkeit mit denen des TBG (11).

Bei Verwendung dieser beiden unspezifischen Effektoren ist eine vollständige Abtrennung des α_1 -Antitrypsins aus den TBG-Präparationen auch mittels der hier beschriebenen Methode nie gelungen.

Eine maximale Ausbeute an TBG aus einem geringen Ausgangsvolumen konnte nur durch stufenweise Elution erreicht werden. Ebenso dauerte die Summe aller Präparationsschritte nicht länger als zwei Tage, womit die Gefahr einer enzymatisch bedingten Degradation des Proteins weitestgehend vermindert war. Die maximale Bindungsfähigkeit des TBG für T₄ ist mit von anderen gefundenen Ergebnissen (9, 13, 27) gut vergleichbar. Sie beweist, daß die Tertiärstruktur der Bindungsstelle für das T₄ durch die vorausgegangene Präparation nicht verändert wurde. Das festgestellte Molekulargewicht von 52800 Dalton befindet sich in dem in der Literatur mitgeteilten Bereich (5, 11, 28).

Reinste TBG-Präparationen, die nach der hier beschriebenen Methode hergestellt wurden, ergaben nach wiederholter Immunisierung von Kaninchen ein monospezifisches Antiserum. Trotzdem war es erforderlich, die aus individuellen TBG-Präparationen durch isoelektrische Fokussierung erhaltenen Subfraktionen immunochemisch zu charakterisieren. Mit polyvalenten und monospezifischen Antiseren gegen menschliche Serumproteine (Behring) konnte kein Resultat erhalten werden. Nur mit dem Antiserum „Kaninchen Immunglobuline gegen das Thyroxin-bindende Globulin“ 10-K 40 konnte mittels zweidimensionaler Immunodiffusion und immunoelektrophoretisch jeweils ein Präzipitat erhalten werden.

Innerhalb der 15 individuellen TBG-Präparationen konnten durch analytische Elektrofokussierung unter Annahme gleicher Farbbindung innerhalb der drei Subfraktionen eindeutig drei Verteilungstypen (Typ I–III) festgestellt werden. Vorläufig bleibt ungewiß, ob die hier beschriebene Mikroheterogenität des TBG bereits bei der Proteinsynthese entsteht oder ob es sich um eine postsynthetische Mikroheterogenität (29) handelt. Die relativ großen pH-Differenzen zwischen den einzelnen isoelektrischen Punkten der drei Subfraktionen könnten auch als Ausdruck einer großen Molekülabilität des TBG angesehen werden. Damit kann nicht gänzlich ausgeschlossen werden, daß die drei Subfraktionen während der Präparation entstehen und eher auf einen postsynthetischen Ursprung hinweisen. Das konstante Auftreten von nur drei Subfraktionen innerhalb der untersuchten Probanden ist aber damit schwer vereinbar, da bei einer postsynthetischen Mikroheterogenität eine

weitaus größere Anzahl von Subfraktionen zu erwarten ist. Aus den vorliegenden Ergebnissen können keine endgültigen Schlüsse über die Ursache für das Auftreten dieser Mikroheterogenität gezogen werden. Da es sich beim TBG um ein Glykoprotein handelt, war auch zu vermuten, daß die einzelnen Subfraktionen sich durch einen unterschiedlichen Neuraminsäuregehalt voneinander unterscheiden. Von *Marshall et al.* (12) wurde aber nachgewiesen, daß die vollständige Abspaltung der endständigen Neuraminsäuren vom Kohlenhydratanteil des Proteins zwar eine Verschiebung der isoelektrischen Punkte aller Subfraktionen in Richtung geringerer Acidität bewirkt, das Bandenmuster aber als solches erhalten bleibt. Eine Artefaktbildung ist deswegen auszuschließen, da die wiederholte Präparation vom selben Probanden das gleiche Verteilungsmuster der Subfraktionen ergab. Unwahrscheinlich ist auch, daß die drei Bänder durch eine unterschiedliche T₄-Bindung hervorgerufen werden, da mit T₄ oder ANS gewonnene Präparationen, unabhängig von der Verunreinigung mit α_1 -Antitrypsin

bei den letzteren, immer das gleiche Verhältnis der Subfraktionen aufwiesen.

Um endgültig zu klären, ob diese Subfraktionen des TBG genetisch bedingt sind, werden derzeit einige Familienuntersuchungen durchgeführt. Weiters wird versucht, größere Mengen an den einzelnen Subfraktionen zu isolieren, um eine physiko-chemische Charakterisierung durchführen zu können.

Danksagung

Besonderer Dank gilt Frau OA. Dr. *Ilse Teubl*, Leiter des Departments für Bluttransfusion und Blutgruppenserologie an der Chirurgischen Universitätsklinik Graz, für die zur Verfügung gestellten Plasmaproben, sowie Herrn Dr. *R. A. Bradwell*, Department of Medicine, University of Birmingham, für die quantitative Analyse des in der Arbeit verwendeten TBG-Standards. Diese Arbeit wurde außerdem vom Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung durch Bereitstellung der analytischen Ultrazentrifuge *Beckman Modell E* unterstützt.

Literatur

- Pickardt, C. R., Bauer, M., Horn, K., Kubiczek, Th. & Scriba, P. C. (1977), *Internist* 18, 538–543.
- Burr, W. A., Ramsden, D. B., Evans, S. E., Hogan, T. & Hoffenberg, R. (1977), *Br. Med. J.* 1, 485–488.
- Hesch, R. D., Gatz, J., Pape, J., Schmidt, E. & von zur Mühlen, A. (1976), *Eur. J. Clin. Invest.* 6, 139–145.
- Pensky, J. & Marshall, J. S. (1969), *Arch. Biochem. Biophys.* 135, 304–310.
- Marshall, J. S. & Pensky, J. (1969), *J. Clin. Invest.* 48, 508–515.
- Tata, J. R. (1961), *Clin. Chim. Acta* 6, 819–832.
- Giorgio, N. A. J. & Tabachnik, M. (1968), *J. Biol. Chem.* 243, 2247–2259.
- Kågedal, B. & Källberg, M. (1977), *Clin. Chim. Acta* 78, 103–111.
- Sterling, K., Hamada, S., Takemura, Y., Brenner, M. A., Newman, E. S. & Inada, M. (1971), *J. Clin. Invest.* 50, 1758–1771.
- Nilsson, S. F. & Peterson, P. A. (1975), *J. Biol. Chem.* 250, 8543–8553.
- Gershengorn, M. C., Cheng, S. Y., Lippoldt, R. E., Lord, R. S. & Robbins, J. (1977), *J. Biol. Chem.* 252, 8713–8718.
- Marshall, J. S., Pensky, J. & Williams, St. (1973), *Arch. Biochem. Biophys.* 156, 456–462.
- Horn, K., Kubiczek, Th., Pickardt, C. R. & Scriba, P. C. (1977), *Klin. Wochenschr.* 55, 881–894.
- Cuatrecasas, P. (1970), *J. Biol. Chem.* 245, 3059–3065.
- Knapp, G. & Spitzzy, H. (1970), *Clin. Chim. Acta* 30, 119–128.
- Knapp, G. & Leopold, H. (1974), *Anal. Chem.* 46, 719–723.
- Laurell, C. B., (1972), *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 29, Suppl. 124, 1–136.
- Kranz, Th., Trautwein, A. & Sieber, A. (1974), *diese Z.* 12, 124–127.
- Greenwood, F. C., Hunter, W. M. & Glover, J. S. (1963), *Biochem. J.* 89, 114–123.
- Thorell, J. I. & Johannsson, B. G. (1971), *Biochim. Biophys. Acta* 251, 363–369.
- Diel, F., Schneider, E. & Quabbe, H. J. (1977), *diese Z.* 15, 669–677.
- Weber, K. & Osborne, M. (1969), *J. Biol. Chem.* 244, 4406–4412.
- Yphantis, D. A. (1964), *Biochemistry* 3, 297–317.
- Mali, N. & Berrie, A. (1972), *Anal. Biochem.* 49, 173–176.
- Duncan, D. B. (1955), *Biometrics* 11, 1–42.
- Chan, C. K., Luby, J. & Wu, Y. C. (1973), *FEBS Lett.* 35, 79–82.
- Cavalieri, R. R., McMahon, F. A. & Castle, J. N. (1975), *J. Clin. Invest.* 56, 79–87.
- Korcek, L. & Tabachnik, M. (1974), *Biochim. Biophys. Acta* 371, 323–336.
- Bours, J. (1976), in *Isoelectric focusing* (Catsimpooolas, N. Hrsg.) S. 225–228, Academic Press, Inc., New York.

Dr. W. Petek
Institut für Medizinische Biochemie
der Universität Graz
Harrachgasse 21/III
A-8010 Graz/Austria